

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Distribution and molecular detection of *Citrus psorosis virus* (CPsV) based on coat protein gene in Cukurova region

Turunçgil Psorosis Virüsü (CPsV)'nün Çukurova bölgesinde dağılımı ve kılıf protein genine göre moleküler olarak tanılanması

Saime Büşra FİDANCI^a, Nüket ÖNELGE^a

^aÇukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 01330 Adana, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.618968](https://doi.org/10.16955/bitkorb.618968)

Received : 11.09.2019

Accepted : 13.05.2020

Keywords:

citrus, CPsV, RT-PCR, biological indexing, Turkey

* Corresponding author: Saime Büşra FİDANCI

✉ busrafidanci@gmail.com

ABSTRACT

This study was conducted in the Cukurova region to determine the prevalence of *Citrus psorosis virus* (CPsV), a citrus disease agent in orange, mandarin, and grapefruit orchards. Biological and molecular characterization of collected plant samples were also carried out and the differences between the CPsV isolates were separated by analyzing nucleotide sequences. For the identification and characterization of CPsV, isolates were collected from 50 different citrus trees showing severe barking lesions, vein banding, and oak leaf pattern symptoms on young leaves, old leaves symptoms. The leaf samples were tested by RT-PCR analysis using different primer pairs to identify the coat protein region of CPsV. For the biological indexing studies, CPsV was inoculated to Pineapple orange (*Citrus sinensis*) plants grown from the seed. Vein banding symptoms and shock reactions of CPsV were observed in the first growth flushes of infected indicator plants during biological indexing assays. As a result of Blast analysis, CPsV in the NCBI GenBank had 98% similarity to nucleotide sequences with corresponding regions of the reference genomes.

GİRİŞ

Turunçgil üretimi ülkemizde en önemli tarım kollarından bir tanesidir. Ülkemiz yaklaşık 125 bin hektar alanda yapılan 4.6 milyon ton üretim ile dünya turunçgil üretiminde önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte Türkiye'deki toplam üretimin %70'i Çukurova Bölgesi'nden sağlanmaktadır (TÜİK 2017). Dünyada virüs ve virüs benzeri hastalıklar,

turunçgil tarımı üzerinde pek çok olumsuz etkiye sahip olup, ekonomik anlamda turunçgil üretimini sınırlayan en önemli faktörlerdendir (Roistacher 1991). Turunçgil virüs hastalıklarından bir tanesi de *Turunçgil psorosis virüsü* (CPsV)'nin neden olduğu Turunçgil kavlama hastalığıdır. Etmen *Ophiovirus* cinsi içinde ss-RNA virüsü olup 3 bölmeli

bir genoma sahiptir (Vaira et al. 2004). CPsV'ye ait partiküller ilk kez Derrick et al. (1993) tarafından tanımlanmış ve partiküllerin oldukça kıvrımlı, iplikli yapıda ve iki farklı biçimde oluşabilen ayırt edilebilir helezonik iplikçiklerden oluştuğu bildirilmiştir. CPsV virionları zarfsızdır ve 3-4 nm çapındaki dairesel iplikçikler halinde olduğu bildirilmiştir (García et al. 1991). Bunlar üç adet tek sarmal, negatif yapıda RNA, RNA polimeraz enzimi ve yaklaşık 48 kDa büyüklüğündeki kılıf proteininden (KP) oluşmaktadır (Derrick et al. 1988, García et al. 1991). RNA1; 8184 nükleotit içerir ve komplementer ipliği (vcRNA) görevi henüz bilinmeyen 24 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlayan iki adet açık okuma çerçevesi (Open reading frame; ORF) içerir. RNA2; yaklaşık 1644 nükleotit uzunluğundadır ve 54 kDa büyüklüğünde görevi henüz bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır. RNA3 ise; 1377 nükleotit uzunluğunda olup, kılıf proteinini (KP) kodlar (Barthe et al. 1998, Sánchez de la Torre et al. 1998). Turunçgil kavlama hastalığı Asya, Güney Amerika ve Akdeniz ülkeleri de dahil olmak üzere turunçgil yetiştirilen ülkelerde ekonomik kayıplara yol açan yaygın bir turunçgil virüs hastalığıdır (Roistacher 1993). Turunçgil kavlama hastalığı etmeninin (CPsV) iki farklı ırkı olduğu tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi hastalığın en çok görülen ve kabuk kavlamasının yalnızca gövde ve ana dallarda ortaya çıkan ırkı olan Psorosis A (PsA), ikincisi ise hastalığın daha şiddetli ırkı olan ve kabuk kavlamalarının ince dallara kadar hızlı bir şekilde genişlemiş Psorosis B (PsB) olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Fawcett and Klotz 1938, Fawcett and Bitancourt 1943). Turunçgil kavlama hastalığının turunçgil ağaçlarında oluşturduğu genç yaprak belirtileri geçici olup yapraklar olgunlaşmaya başladıktan sonra kaybolmaktadır. Fakat hastalığın şiddetli formu olan PsB varyantında enfekteli ağaçların olgun yapraklarında kalıcı belirtiler oluşturmaktadır. Genç yapraklarda oluşan damar bantlaşması şeklindeki belirtiler birleşerek olgun yapraklarda kalıcı klorotik lekeler meydana getirmekte, bazen de olgun yapraklarda meşe yaprağı desenini koruyacak şekilde yarı şeffaf alanlar ortaya çıkmaktadır (Timmer et al. 1980, Wallace 1968). Kaliforniya'da 6.000 ağaçta yapılan survey sonucunda ağaçların %14'nün CPsV ile bulaşık olduğu hastalığın üründe meydana getirdiği azalma sonucu %6.5 oranında bir gelir kaybı oluşturduğu tespit edilmiştir (Knorr and Childs 1968). CPsV'nin biyolojik olarak tanımlanmasında en uygun indikatör bitkilerin Pineapple, Parson Brown, Hamlin, Koethen ve Madam Vinous portakal çeşitleri olduğu ancak diğer turunçgil çeşitlerinin de CPsV'nin genç yaprak belirtilerini geliştirebildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Wallace 1968). CPsV'nin PsA ve PsB varyantlarının genomik dizilimlerinin farklılıklarını belirlemek için yapılan bir çalışmada biyolojik

karakterizasyonu gerçekleştirilmiş P121 ve PsF izolatları kullanılarak Pineapple portakal fidanları üzerine simptomsuz ve kabuk kavlama belirtili olarak inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonu gerçekleştirilen bitkilere yapılan SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analizleri sonucunda PsA ve PsB varyantlarının RNA1 ve RNA3 bölgelerinde hiçbir farklılık gözlenmez iken SSCP analizi sonucunda RNA2 bölgelerinde farklılık olduğu gözlemlenmiş ve PsB varyantının CPsV'nin RNA2 dizilimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Velazquez et al. 2012). Türkiye'de CPsV'nin varlığı ilk kez 1963 yılında Norman tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde belirlenmiştir (Norman 1963). Kayım (2010), CPsV'nin biyolojik ve moleküler tanımlanmasını gerçekleştirmek için Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaptığı bir çalışmada CPsV nin genç yaprak belirtilerinin varlığını indikatör bitkiler üzerinde gözlemlemiş ve RT-PCR yöntemi ile tanımlanmış ancak nükleotid dizilimlerini belirlememiştir. Antalya ili turunçgil üretim alanlarında yapılan bir çalışmada yapılan surveylerde belirlenen 51 şüpheli ağaçtan alınan yaprak ve sürgün örnekleri CPsV ile enfekteli olup olmadığını belirlemek amacıyla öncelikle DTBIA ve ELISA yöntemiyle test edilmiştir. Yapılan testlemlerde 6 örneğin CPsV ile enfekteli olduğu saptanmıştır ve örneklerin total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, CPsV'nin KP geni RT-PCR yöntemi kullanılarak ve sekans analizleri sonucunda belirlenmiştir (Kütük 2011). Ülkemizde Psorosis hastalığı ile ilgili birçok çalışma yürütülmüş fakat hastalığın varyantlarının genomik farklılıkları ile ilgili hiçbir çalışma yürütülmemiştir. Bu çalışma Çukurova Bölgesi'nde hastalığın farklı varyantlarının yaygınlık durumunun belirlenmesi ve aynı zamanda bu izolatların genomik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

MATERYAL VE METOT

Survey çalışmaları

Çalışma Çukurova Bölgesi Adana, Mersin ve Hatay illerindeki 10 dekardan ve 10 yaşından büyük portakal, mandarin ve altıntop bahçelerinde gerçekleştirilmiştir. Survey çalışmaları bitkilerin aktif sürgün döneminde olduğu ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde yapılmıştır. CPsV'nin yaygınlığının belirlenmesinde hastalığın karakteristik belirtilerinden olan genç yaprak belirtileri ve kabuk kavlaması gösteren ağaçlar değerlendirilerek hastalığın yaygınlık durumu belirlenmiştir.

Biyolojik indeksleme çalışmaları

Çalışmada kullanılan turunçgil örnekleri, Çukurova Bölgesi'ndeki eski turunçgil bahçelerinden CPsV ile bulaşık olduğu tahmin edilen genç yapraklarda damar bantlaşması

ve meşe yaprağı deseni simptomları, kabuk kavlama, şiddetli kabuk kavlama, yaşlı yaprak simptomları gösteren ağaçlardan alınmış ve örnekleme her bir ağacın farklı yönlerinden üçer adet sürgün olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılmış olan indikatör bitkiler Pineapple portakal tohumlarından yetiştirilmiştir. Fidanların gövde kalınlığı kalem boyutuna ulaştığında göz ve kabuk aşılması olarak inokulasyonlar yapılmıştır. Çukurova Bölgesi'nden toplam 5 adet izolat toplanmış ve her bir izolat için 3'er adet indikatör bitki kullanılarak biyolojik indeksleme çalışması gerçekleştirilmiştir. İndikatör bitkiler haftalık olarak yaprak simptomları ve şok reaksiyonları açısından gözlemlenmiştir. Bitkiler 2 ay sonra geriye doğru budanmış ve yeni sürgünlerin gelişmesi sağlanarak hastalık belirtileri gözlemlenmeye çalışılmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmalarında etmenin bulaşık olduğu fidanlarda oluşan genç ve olgun yaprak simptomları baz alınarak değerlendirilmiştir.

RT-PCR çalışmaları

CPsV'nin moleküler olarak tanımlanmasının ilk aşamasında araziden sadece genç yaprak simptomu, yaşlı yaprak simptomu, genç yaprak simptomu ve kabuk kavlama simptomunu birarada gösteren farklı turuncgil türlerinden (mandarin, portakal, altıntop) toplanan 50 farklı izolat CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tampon çözeltisi kullanılarak total nükleik asitler (TNA) elde edilmiştir (Murray and Thompson 1980). Elde edilen TNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi ve PCR çalışmaları yapılmıştır. PCR çalışmaları farklı primer çiftleri kullanarak klasik PCR (Barthe et al. 1998) ve Nested-PCR (Kütük 2011) olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri Çizelge 1'de belirtilmektedir.

Elektroforez çalışmaları

Elektroforez çalışmaları %1.5 agaroz jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi etidyum bromür çözeltisi ile yapılmış ve jeller UV transilluminatör kullanılarak görüntülenmiştir.

Sekans analizi ve verilerin karşılaştırılması

PCR ve agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda pozitif bulunan örnekler, aynı koşullarda RT-PCR uygulanarak 200 µl hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan tüm örnekler saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Molgentek (Adana) firmasına gönderilmiştir. Firmanın nükleotid dizilimleri belirleme çalışmaları, gönderilen etmenlerin "forward" ve "reverse" primerlerine göre iki ayrı şekilde gerçekleştirilmiştir. Sekanslama işlemi tamamlanan tüm örneklerin baz dizilimleri "Finch TV" 1.4.0."(Geospiza, Inc.) programı kullanılarak görüntülenip, mevcut baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında "BLAST" yöntemiyle kayıtlı bazı organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri "Mega X" (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Proprietary freeware) programı kullanılarak "Neighbour Joining" metodu ile sınıflandırılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

CPsV hastalığının survey çalışmaları ile yaygınlığının belirlenmesi

Çukurova Bölgesi'nde bitkilerin aktif sürgün döneminde olduğu ilkbahar ve sonbaharda yapılan surveylerde CPsV'nin karakteristik genç yaprak simptomlarından olan damar bantlaşması ve meşe yaprağı deseni simptomlarını gösteren ve kabuk kavlaması simptomu gösteren ağaçlar hastalıkla

Çizelge 1. Psorosis virüsünün RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Primerler	Sekans Dizilimi (5'-3')	Çoğaltılan Bölge (bp)	PCR yöntemi
BC76	ATGTCGATCCWATYAAGTSTCAC	1320 bp	Nested-PCR (Kütük 2011)
BC77	TTACATAGTYGMWGCYACCCCAAAG	1320 bp	
BC78	TGCTCCAACAAAGAAATTC	350 bp	
BC79	TTCTGCCATCTGGAGTGAGGC	350 bp	Klasik-PCR (Barthe et al. 1998)
CPV-1	GCTTCCTGGAAAAGCTGATG	600 bp	
CPV-2	TCTGTTTTGTCAACACACTCC	600 bp	



Şekil 1. Sürvey çalışmalarında portakal ağacında gözlemlenen a) damar bantlaşması simptomsu, b) meşe yaprağı görüntüsü simptomsu c) kabuk kavlama simptomsu

bulaşık olarak kabul edilmiştir (Şekil 1).

Fawcett (1933) yaptığı bir çalışmada CPsV'nin kabuk kavlama simptomsunun yanında genç yaprak simptomsunu da tanımlamıştır. Yapılan bu çalışmada da incelenen ağaçların CPsV ile bulaşık olduğunun belirlenmesinde hastalığın karakteristik simptomsu olan genç yaprak simptomsu ve kabuk kavlama simptomsu baz alınarak değerlendirmeler yapılmıştır. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Çukurova Bölgesi'nde toplamda 11.150 ağaç incelenmiş incelenen ağaçların %33 oranında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. CPsV ile bulaşık olduğu belirlenen ağaçların % dağılımları

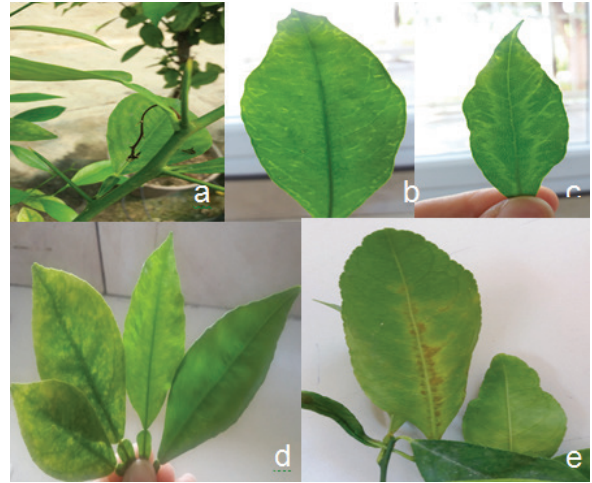
İl	Portakal	Mandarin	Altıntop	Toplam Enfeksiyon (%)
Adana	30	25	10	25
Mersin	50	30	20	36.5
Hatay	35	40	14	37.5
Toplam Enfeksiyon %	38.3	31.3	13.04	33

Yapılmış olan bu çalışmada Çukurova Bölgesi'nde incelenen 4.100 tane portakal ağacının %38.3'nün, 5.800 mandarin ağacının %31.3'nün, 1.250 tane portakal ağacının %13.04'nün CPsV hastalığı ile bulaşık olduğu hastalığın en çok portakal türünde görüldüğü bunu sırasıyla mandarin ve altıntop türlerinin izlediği belirlenmiştir. Güllü (1989) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan bir sürveyde ise Navel cinsi portakallarda %64-80, Satsuma cinsi mandarinlerde %15.8-31 oranında CPsV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacı yapmış olduğu çalışmada bölgede aktif sürgün döneminde genç yaprak simptomsunun oldukça yoğun olduğunu, ancak olgun yaprak simptomsunun daha az gözlemlendiğini özellikle şiddetli kabuk kavlaması gözlenen ağaçlarda görüldüğünü bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada

da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Aktif sürgün döneminde genç yaprak simptomsu oldukça yoğun olmakla birlikte bu simptomsu yapraklar olgunlaştığında kaybolmaktadır. Kavlama hastalığı ile bulaşık bahçelerde damar bantlaşması ve meşe yaprağı deseni simptomsu oldukça yoğun olarak bulunmakta olup aynı hastalığın simptomsundan olan beneklenmeler ve klorotik lekeler daha az görülmektedir. Ayrıca psorosis hastalığının kabuk kavlama simptomsu yaşlı bahçelerde görülmekle birlikte bu simptomsu genç yaprak simptomsuna oranla daha azdır.

CPsV hastalığının biyolojik indeksleme yöntemi ile tanınması

Pineapple portakalına doku inokulasyonu yöntemi ile aktarılan CPsV hastalığının yaklaşık iki ay gibi bir süre sonunda portakal fidanlarının uç sürgünlerinde hastalığın karakteristik özelliği olan şok reaksiyonları gözlenmiştir. Ayrıca genç yapraklarda damarlar üzerinde açık renkli damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü gözlemlenmiştir. Yaşlı yapraklarda ise yaprağın üst kısmında düzensiz klorotik lekeler ve arka kısmında kahverengi kalıcı zamklı lekelerin varlığı belirlenmiştir (Şekil 2). Genç yapraklar üzerinde gelişen simptomsu büyük bölümü yapraklar olgunlaştığında kaybolmuşlardır. Negatif kontrol olarak bırakılan sağlıklı Pineapple fidanlarında CPsV'nin genç yaprak simptomsuna rastlanmamıştır.



Şekil 2. Psorosis virüsünün Pineapple portakal çeşidinde biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda gözlemlenen a) şok reaksiyonu, b) genç yapraklarda damar bantlaşması simptomsu, c) genç yapraklarda meşe yaprağı deseni simptomsu, d) yaşlı yapraklarda klorotik lekeler, e) yaşlı yaprakların arka kısmında zamklı kabarcıklar

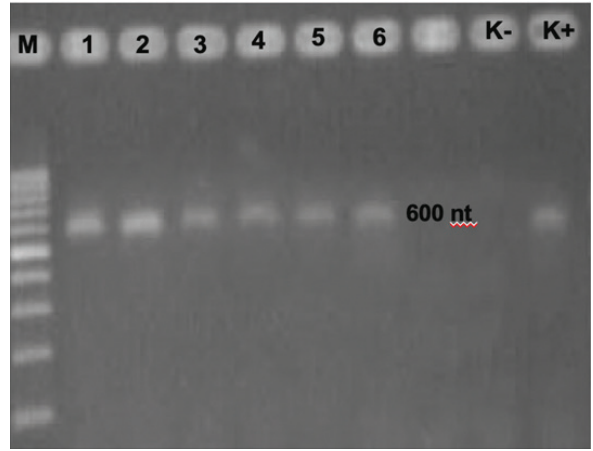
Kayım (2010) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde CPsV'nin biyolojik indeksleme yöntemiyle tanınmasını gerçekleştirmek için yapılan bir çalışmada bir yaşındaki

portakal fidanlarına Adana, Mersin, Koza bölgelerindeki hastalıkla bulaşık olduğu bilinen ağaçlardan alınan örneklerin inokulasyonu sonucunda indikatör bitkilerin genç yaprakları üzerinde damar bantlaşması, beneklenme ve meşe yaprağı görüntüsü simptomlarını gözlemlediğini bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada da Çukurova Bölgesi'nde CPsV'nin genç yaprak simptomları, kabuk kavlama simptomları, yaşlı yaprak simptomları gösteren ağaçlardan alınan örnekler ile yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında genç yapraklarda damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü simptomları gözlemlenmiştir. Şiddetli kabuk kavlama simptomu sergileyen ağaçlardan alınan örnekler Pineapple indikatör bitkilerinde genç yaprak simptomlarının yanı sıra olgun yaprak simptomları da geliştirmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda genç yaprak simptomlarının PsA ile ilgili bulunurken olgun yaprakların arka yüzeyinde gelişen hafif zamklı yağ lekelerinin PsB tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Fawcett and Bitancourt 1943, Velázquez et al. 2012). Yapmış olduğumuz biyolojik indeksleme çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Araziden alınan ve olgun yaprak simptomları göstermeyen ağaçlardan yapılan biyolojik indeksleme sonucunda Pineapple indikatör bitkilerinin yapraklarında sadece damar bantlaşması şeklinde genç yaprak simptomları gözlenmiştir (Şekil 2b). Araziden alınan ve kabuk simptomları yanında olgun yapraklarda Turunçgil kavlama hastalığının simptomunu sergileyen ağaçlardan yapılan indeksleme çalışması sonucunda indikatör bitkilerde önce damar bantlaşması şeklinde genç yaprak simptomları daha sonra yaprakların arka yüzeyinde gelişen zamk belirtileri ve lekelenmeler gözlenmiştir (Şekil 2e). Kabuk kavlama simptomlarının PsA ve PsB sendromlarıyla ilgili olduğu, ancak PsB sendromunun bölgemizde yaygın olarak bulunmadığı, hafif şiddette gelişen kabuk kavlamaları ve genç yaprak simptomları ile ilişkilendirilen PsA sendromunun bölgemizde daha yoğun bulunduğu yapılan survey çalışmaları ve biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda belirlenmiştir.

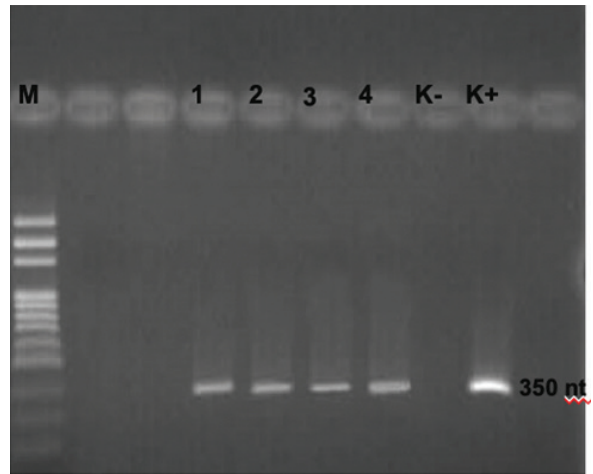
CPsV'nin RT-PCR çalışmaları ile tanınması

Yapılan RT-PCR çalışmalarının sonucunda CPV-1/CPV-2 primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 600 bp'lık (Şekil 3), BC78/BC79 primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 350 bp (Şekil 4) bant oluşumu gözlemlenmiştir. Araziden alınan örneklerde yukarıda verilen baz uzunluğunda bant oluşumları hastalık etmenini taşıdığı kabul edilerek pozitif olarak değerlendirilmiştir. CPsV'nin farklı turunçgil izolatları kullanılarak yapılan RT-PCR çalışmalarından elde edilen jel görüntüleri aşağıda Şekil 3 ve Şekil 4 de yer almaktadır.

Çukurova Bölgesi turunçgil bahçelerinden CPsV ile bulaşık olduğu düşünülen ağaçlardan alınan örneklerle farklı primer



Şekil 3. CPsV'ye ait RT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü, M: Markör (100 bp), 1-2-3-4-5-6: Pozitif örnekler, K-: Negatif Kontrol, K+: Pozitif Kontrol



Şekil 4. CPsV'ye ait RT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü, M: Markör (100 bp) 1-2-3-4: Pozitif örnekler, K-: Negatif Kontrol, K+: Pozitif Kontrol

çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR çalışmalarında, toplanan 50 örneğin 35'nin CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Kullanılan primer çiftlerinden CPV-1/CPV-2 ve BC78/BC79 etmenin rutin tanınmasında her zaman başarılı sonuçlar vermiştir. RT-PCR sonucunda en iyi sonuç veren örnekler şiddetli kabuk kavlaması ve genç yaprak simptomu oluşturan örnekler olmuştur. Bu sonuç Çukurova Bölgesi'ndeki tüm iller için geçerlidir. Sadece genç yaprak simptomu oluşturan örneklerden alınarak yapılan RT-PCR çalışmaları, kabuk kavlaması simptomu gösteren ağaçlardan alınan örneklerle yapılan RT-PCR çalışmaları kadar iyi sonuç vermemiştir. CPsV konsantrasyonunun kabuk kavlaması oluşturmeyen ağaçlarda kabuk kavlaması simptomu gösteren ağaçlardan daha az yoğunlukta olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Barthe et al. (1998) tarafından CPsV'nin

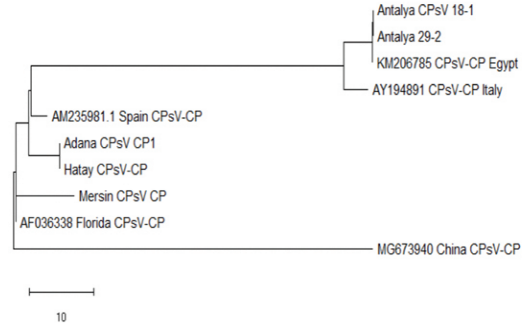
kılıf protein geni dizisini belirlemek için yapılan bir çalışmada biyolojik karakterizasyonu yapılmış, CPV-4 ve CPV-6 izolatları RT-PCR analizinde CPV1 ve CPV2 primer çifti kılıf protein geninin 654 ve 1253 nükleotidleri arasındaki 600 bp'lık alanı çoğaltmak için tasarlanmıştır. Araştırmacıların yaptıkları RT-PCR çalışmalarında 600 bp seviyesinde kılıf protein bantlarını elde etmişlerdir. Barthe et al. (1998) tarafından kılıf protein gen dizisini belirlemek için tasarlanan primer çiftinin kullanıldığı (CPsV-1/ CPsV-2) bu çalışmada da araziden toplanan ve genç yaprak semptomları ve kabuk kavlaması semptomları sergileyen ağaçlardan alınan örnekler RT-PCR sonucunda 600 bp'lık kılıf protein geni elde edilmiştir (Şekil 3). RT-PCR çalışmalarında araziden toplanan 50 örnek içinde sadece genç yaprak semptomu sergileyen ağaçlardan alınan örneklerden bir kısmı oldukça zayıf bant oluştururken, kabuk kavlaması semptomu geliştiren ağaçlardan alınan örneklerin hepsi 600 bp seviyesinde kılıf proteinine ait bant gelişimi göstermiştir.

Kütük (2011), Antalya ilinin farklı turuncgil üretim alanlarından alınan turuncgil örnekleri ile yapmış oldukları bir çalışmada kılıf protein geni belirlemek için BC76/BC77 primer çiftlerini kullanmışlardır. Dahasonra elde ettiği ürünler ile BC78/BC79 primer çiftlerini kullanarak nested-PCR ile genin 759 ve 1139 nükleotidleri arasındaki bölgeyi tanılamak için çoğaltmışlardır. Yapılan analizler sonucunda 51 örneğin 45 tanesinde 350 bp'lık bant elde etmişlerdir. CPsV'nin belirlenmesinde örnekleme zamanına bakılmaksızın hastalığın etkin bir şekilde tanıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da nested-PCR gerçekleştirilmiş ve BC78/BC79 primer çifti kullanılmıştır. RT-PCR sonucunda 350-400 bp'lık kılıf protein geni elde edilmiş (Şekil 4), çoğaltılmış ve sekans analizine gönderilmiştir. Çalışmada kullanılan genç ve olgun turuncgil yapraklarından yapılan analizlerde benzer sonuçlar elde edilerek araziden alınan örneklerin 35 tanesinde 350 bp seviyesinde pozitif sonuç elde edilmiştir.

Nested-PCR sonucunda %2 agaroz jelde elde edilen bantlar klasik RT-PCR çalışmalarına oranla daha belirgin bir bant oluşumu sergilemiştir (Şekil 4).

Filogenetik analiz çalışmaları

Bu çalışmada, nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda dünyada turuncgil yetiştirilen bölgelerde oldukça yaygın bulunan bir virüs hastalığı olarak CPsV'nin farklı turuncgil türlerinden alınan örneklerin RNA3 bölgesinin (kılıf protein geni) İspanya izolatları (Gen Bankası Erişim No:AM235981) ile %96 oranında benzerlik gösterdiği, Florida izolatları (Gen Bankası Erişim No:AF036338) ile %98 oranında benzerlik gösterdiği (Şekil 5) belirlenmiştir. Bu çalışmada ele alınan Çukurova Bölgesi izolatlarının da birbiri ile %98'in üzerinde benzerlik



Şekil 5. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turuncgil türlerinden alınan örneklerin kılıf protein (RNA3) bölgesinin dünyadaki farklı izolatlarla karşılaştırılması

gösterdiği filogenetik analiz sonucunda ortaya konmuştur. Turuncgil kavlama hastalığı çok uzun yıllardır bilinmesine rağmen etmenin moleküler tanısı 2000'li yıllardan sonra gerçekleştirilebilmiştir. Bu nedenle bu zamana kadar benzer yaprak semptomları gösteren pek çok hastalık etmeni psorosis grubu hastalıklar olarak bu gruba eklenmiştir. Ancak moleküler tanı yönteminin devreye girmesi ile grup içinde yer alan ve benzer yaprak semptomları sergileyen hastalıklar bu gruptan ayrılmıştır. Günümüzde Turuncgil kavlama hastalığı genç yapraklarda aktif sürgün döneminde geliştirdiği damar bantlaşması semptomları ve genellikle aşı birleşme noktasından başlayarak ilerleyen kabuk kavlamaları ile makroskobik olarak teşhis edilebilen etmeni CPsV olarak değerlendirilen bir hastalıktır. Yürütülen bu çalışma sonucunda Turuncgil kavlama hastalığının Çukurova Bölgesi'nde yaygın bir hastalık olduğu, ancak kabuk kavlaması semptomu oluşturan ve yaşlı yapraklar üzerinde olgun yaprak semptomları sergileyen şiddetli ırklarının çok eski yetiştiricilik alanlarında bulunduğu belirlenmiştir. Yaşı 20'nin altındaki genç turuncgil bahçelerinde etmenin kabuk kavlama semptomunu görmek mümkün değildir ancak genç yaprak semptomlarını her yaşta taze sürgünlerde yer alan yapraklarda görmek mümkündür. Çalışma sonucunda bölgemiz turuncgil bahçelerinde bulunan CPsV'nin moleküler, biyolojik indeksleme ve arazi semptomları ile tanısı gerçekleştirilmiştir. Hala sertifikalı fidan yetiştiriciliğine geçememiş olan bölgemizde, CPsV önemli bir hastalık etmeni olarak yetiştiricilik alanlarında yer almaktadır. Moleküler tanılamının sertifikasyon programlarında ve sağlıklı turuncgil fidan yetiştiriciliğinde mutlaka kullanılması gereken bir yöntem olarak ele alınması ve primer seçiminde dikkatli olunması gerekmektedir. Rutin tanılamada kılıf protein bölgesinin kullanılması hastalığın tanılanmasında başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı finanse eden Çukurova Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz. Proje Numarası: FYL-2016-6198

ÖZET

Bu çalışmada, Çukurova Bölgesi'nde Turunçgil kavlama hastalığı etmeni *Citrus psorosis virus* (CPsV)'nin portakal, mandarin ve altıntop bahçelerinde yaygınlığı belirlenmiş, alınan bitki örneklerinin biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. CPsV izolatlarının arasındaki farklılıklar nükleotid dizilimleri analiz edilerek belirlenmiştir. CPsV'nin tanılanması ve karakterizasyonu için 50 farklı turunçgil ağacından şiddetli kabuk kavlama lezyonu ve genç yapraklarda damar bantlaşması, meşe yaprağı deseni simptomu, yaşlı yaprak simptomları gösteren farklı izolatlar toplanmıştır. Toplanan örnekler RT-PCR çalışmalarıyla analiz edilmiştir. Kullanılan farklı primer çiftleri ile CPsV'nin kılıf protein bölgesi belirlenmiştir. Yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında ise tohumdan yetiştirilen Pineapple portakal (*Citrus sinensis*) fidanlarına CPsV'nin inokulasyonu yapılmış ve enfekteli indikatör bitkilerin ilk gelişen sürgünlerinde CPsV'nin damar bantlaşması ve şok simptomları gözlemlenmiştir. Blast analizi ve NCBI gen bankasındaki CPsV'nin referans genomlarının karşılık gelen bölgeleri ile nükleotid dizilimlerinin %98 oranında benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: turunçgil, CPsV, RT-PCR, biyolojik indeksleme, Türkiye

KAYNAKLAR

Barthe G.A., Ceccardi T.L., Manjunath K.L., Derrick K.S., 1998. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *Journal of General Virology*, 79 (Pt 6), 1531-1537.

Derrick K.S., Bransky R.H., da Graça J.V., Lee R.F., Timmer L.W., Nguyen T.K., 1988. Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology*, 78 (10), 1298-1301.

Derrick K.S., Lee R.F., Hewitt B.J., Barthe G.A., 1993. Spiroviruses: a new group of serologically diverse plant viruses associated with citrus psorosis and ringspot. In: *Proceeding 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, 428-429, IOCV, Riverside, CA.

Fawcett H.S., 1933. New symptoms of psorosis indicating a virus disease of citrus. *Phytopathology*, 23, 930. (Abstract)

Fawcett H.S., Bitancourt A.A., 1943. Comparative

symptomatology of psorosis varieties on citrus in California. *Phytopathology*, 33, 837-864.

Fawcett H.S., Klotz L.J., 1938. Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopathology*, 28, 670.

García M.L., Grau O., Sarachu A.N., 1991. Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Research in Virology*, 142 (4), 303-311.

Güllü M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel grubu portakalı ve Satsuma mandarin ağaçlarında yaygın virus ve virus benzeri hastalıkların surveyi ve indekslenmesi üzerinde çalışmalar. Doktora Tezi, 70 s. Araştırma Yayınları Serisi, Ankara.

Kayım M., 2010. Biological and molecular detection of Citrus psorosis virus in citrus in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 19 (2), 259-262.

Knorr L.C., Child J.F.L., 1968. Incidence and spread of citrus viruses: control methods and programs. production of virus-free budwood in citrus past, present, and future. In: Price W.C., (Ed.). *Proceedings 4 th. Conference of the International Organization Of Citrus Virologists Univ. Florida Press, Gainesville*, 351-357 p.

Kütük B., 2011. Antalya ili turunçgil alanlarında psorosis virüsünün belirlenmesi, biyolojik ve moleküler karakterizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 65 s., Isparta.

Murray M.G., Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8 (19), 4321-4325.

Norman P.A., 1963. Report to government of Turkey on citrus virus diseases. *FAO Report Rome*, No: 1641, 16 p.

Roistacher C.N., 1991. Psorosis complex: psorosis-A, psorosis-B and ringspot. In: *Graft-transmissible diseases of citrus, Handbook for Detection and Diagnosis*. Food, Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Rome, Italy, 115-126 p.

Sánchez de la Torre E., Riva O., Zandomeni R., Grau O., Garcí'a M.L., 1998. The top component of citrus ringspot virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the CP. *Molecular Plant Pathology*, Online [http://194.247.68.33/mppol/1998/1019_sanchez/] (Erişim tarihi 07.06.2019).

Timmer L.W., Garnsey S.M., 1980. Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In: Calavan E.C., Garnsey S.M.,

Timmer L.W., (Eds.). Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA, USA: IOCV, 167–193.

TÜİK 2017. www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi 07.06.2019).

Vaira A.M., Accotto G.P., Gago-Zachert S., Garcia M.L., Grau O., Milne R.G., Morikawa T., Torok V., Verbeek M., Vetten H.J., 2005. Ophiovirus. Type species Citrus psorosis virüs (CPsV). In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., (Eds.). Virus Taxonomy, 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK: Elsevier, Academic Press, 673-679.

Velázquez K., Pina J.A., Navarro L., Moreno P., Guerr J., 2012. Association of citrus psorosis B symptoms with a sequence variant of the Citrus psorosis virus RNA2. *Plant Pathology*, 61 (3), 448–456.

Wallace J.M., 1968. Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus. In: Proceedings of the 4th Conference, IOCV. Univ. Florida Press, Gainesville, 177-183 p.

Cite this article: Fidancı, S, Önelge, N. (2020). Turunçgil Psorosis Virüsü (CPsV)'nün Çukurova bölgesinde dağılımı ve kılıf protein genine göre moleküler olarak tanılanması. *Plant Protection Bulletin*, 60-2. DOI: 10.16955/bitkorb.618968

Atf için: Fidancı, S, Önelge, N. (2020). Distribution and molecular detection of Citrus psorosis virus (CPsV) based on coat protein gene in Cukurova region. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-2. DOI: 10.16955/bitkorb.618968